

グリシン培地で培養した*A.globiformis*抽出液による グリシン合成及びグリシン解裂反応について

著者	高地 英夫
号	614
発行年	1970
URL	http://hdl.handle.net/10097/18719

氏 名 (本 籍) こう ち ひで か
高 地 英 夫

学 位 の 種 類 医 学 博 士

学 位 記 番 号 医 博 第 6 1 4 号

学位授与年月日 昭 和 4 5 年 3 月 2 5 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当

研究科専門課程 東北大学大学院医学研究科
(博士課程) 生理学系専攻

学位論文題目 Reactions of glycine synthesis and
glycine cleavage catalyzed by ext-
tracts of *Arthrobacter globiformis*
grown on glycine
(グリシン培地で培養した *A. globiformis*
抽出液によるグリシン合成及びグリシン解裂
反応について)

(主 査)

論文審査委員 教授 菊 地 吾 郎 教授 吉 沢 善 作

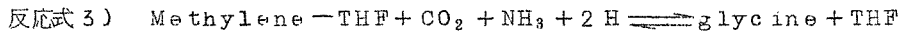
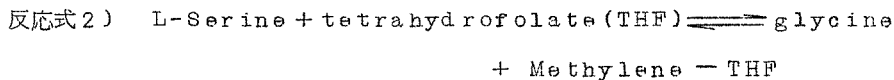
教授 立 木 蔚

論 文 内 容 要 旨

グリシン及びセリンの代謝には、セリンハイドロオキシメチルトランスフェラーゼが重要な役割をはたしていることは既に良く知られている。しかしここ数年来、種々の動物、植物及びバクテリア系で、グリシンの α -炭素がセリンの β -炭素になるという事実が報告され、セリンハイドロオキシメチルトランスフェラーゼ以外の酵素が関与すると考えられる反応式1)が示唆されてきた。



更にラット肝ミトコンドリアでは上の反応が可逆的であり、又反応式2)及び3)のnet reactionとして存在することが確認された。



反応式2)は、セリンハイドロオキシメチルトランスフェラーゼにより触媒される。しかしながら植物系又は、バクテリア系では、反応式3)によるグリシン合成反応の存在は未だ確認されていない。本論文は、*Arthrobacter globiformis* の無細胞抽出液が、ラット肝ミトコンドリアの場合と同様にセリンハイドロオキシメチルトランスフェラーゼ活性を示すのみならず、反応式3)をも触媒しMethylene-THF又はホルムアルデヒドを基質としたグリシン合成反応を行うことを証明したものである。実験に用いた酵素標品は、*A. globiformis*をグリシンを単一炭素及び窒素源として培養し、菌体を洗い、音波処理後 $10^5 \times g$ の上清を透析したものである。

I) L-セリン, メチレン-THF 又はホルムアルデヒドからのグリシン合成反応

$\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ を用いて確気条件下に ^{14}C -グリシンの生成をみると基質としての C_1 供与体及びアムモニアの他に、反応にはDTT(ダイサイオスレイトウル)及びピリドキサル磷酸が必要である。L-セリン又はホルムアルデヒドを C_1 供与体として用いた場合には、THFを加えなくとも特に活性の低下は認められない。しかしDowex-1(Cl^- 型)で処理した酵素標品を用いると反応には、THFを必要とすることが明らかである。おそらく粗酵素には、反応に充分な量のTHFが結合しているものと考えられる。又*A. globiformis*の場合には、ラット肝ミトコンドリアの場合とは異なり C_1 供与体としてメチレン-THF又はホルムアルデヒドを用いた時に反応初速度においても、L-セリンの効果には及ばない。この結果は、酵素標品に著しく強いL-セリントランスフェラーゼ活性が存在していることに起因すると考えられる。又NADHが水素供与体として特に効果

がみられなかつたが、これは用いた酵素標品の NADH オキシデース活性が強いためである。GSH (還元型グルタチオン) 又は 2-メルカプトエタノール等の mono thiol 化合物は DTT の代用とはならなかつた。即ちダイサイオール酵素の関与も示唆される。

II) グリシンの解裂反応

好気条件下にグリシン-1- ^{14}C の解裂の活性を $^{14}\text{CO}_2$ の生成から考察すると、反応にはサイオール化合物、ピリドキサル燐酸の他に NAD を必要とした。グリシン解裂反応が酸化的反応であるにも拘らず DTT 又は GSH の様なサイオール化合物を必要とし、しかも 30 mM GSH を用いると至適濃度 (5 mM) の DTT を用いた時とほぼ同程度の活性がみられた。これはグリシン合成反応の際の DTT の効果とは異なる機能によると考えられ、おそらくその効果は、酵素の活性化によるものであろう。又グリシン解裂反応における THF の必要性はグリシン合成反応の場合と同様に Dowex-1 (Cl⁻型) で処理した酵素標品を用いることによつて明らかにされた。グリシン解裂反応の際にグリシン-1- ^{14}C を用いると生成する $^{14}\text{CO}_2$ と ^{14}C -セリンはほぼ当量であるがグリシン-2- ^{14}C を用いると $^{14}\text{CO}_2$ は殆んど生成されずグリシン-1- ^{14}C を用いた場合の約 2 倍の ^{14}C -セリン生成が認められた。更にグリシン合成反応の際に放射性物質として $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ 或いはセリン-3- ^{14}C のいずれを用いても同程度の ^{14}C -グリシンが生成された。これらのことは即ちグリシン合成及び解裂反応は可逆的な同一の反応であり 2 分子のグリシンから各 1 分子のセリン、炭酸ガス及びアムونياが生成されることを証明している。

III) グリシンと炭酸ガスの交換反応

Peptococcus glycinophilus 及びラット肝ミトコンドリアでは反応式 3) の部分反応として適当な条件下でグリシンと炭酸ガスの交換反応が起ることが報告されている。この反応は THF の添加により阻害される。*A. globiformis* の無細胞抽出液もグリシンと炭酸ガスの交換反応を触媒し Dowex-1 (Cl⁻型) で処理した酵素標品を用いた実験では交換反応は、THF によつて明らかに阻害された。交換反応にはピリドキサル燐酸及び DTT 又は GSH の様なサイオール化合物を必要とするが更に NAD を添加すると交換反応活性は著明に増大する。これは Dowex-1 (Cl⁻型) で処理した酵素標品又は未処理酵素標品のいずれでも認められた現象である。この様な交換反応におけるサイオール化合物及び NAD の共存による効果は適当な酸化還元の状態が交換反応を開始し易くする為と考えられる。

以上の結果はラット肝ミトコンドリアの場合と本質的には、まったく同一でありバクテリア系でも動物系と同じくセリンハイドロオキシメチルトランスフェラーゼ以外の酵素が関与するグリシン合成並びに解裂反応の存在が確認された。

審 査 結 果 の 要 旨

本論文はグリシンおよびセリン代謝において、グリシン解裂反応が果たす役割、およびグリシン解裂反応の機構を明らかにする目的で、*Arthrobacter globiformis* の無細胞抽出液を用いて行つた研究の報告である。本菌はグリシンのみを栄養源とした培地でよく生育し、極めて活潑なグリシン代謝能を持つ点で、本研究にとつて甚だ有利な材料である。

先ずL-セリンあるいはメチレン-THF、ホルムアルデヒドからのグリシン合成反応を追究した結果、 $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ を標識基質とした場合のグリシン合成にはアンモニアのほかにDTT (dithiothreitol) およびピリドキサルリン酸が必要であること、またDowex-I 処理した酵素標品を用いるとTHFの添加が必要であることを、を明らかにした。すなわち、従来ラット肝その他で証明されたグリシン合成反応と同一の形式の反応が本菌においても起ることを示した。

次にグリシン- $1-^{14}\text{C}$ を基質としてその解裂反応を試みた結果、本菌ではグリシン→メチレン-THF + CO_2 + NH_3 + 2Hの反応が起つていることを確実に証明した。また本反応系ではグリシン解裂と平行して、 $^{14}\text{CO}_2$ 発生量とほぼ匹敵する量の ^{14}C -セリンが合成された。すなわち、グリシン合成反応とグリシン解裂反応とは完全に可逆的であることをさらに確実に証明した。

第3に、本菌抽出液はグリシンと CO_2 との交換反応をも触媒することを明らかにした。しかもこの反応はTHF添加によつて強く抑制された。これは交換反応がグリシン解裂反応の部分反応であることを示すものである。さらに、交換反応はNADおよびDTTの共存下に最もよく進行したが、これは交換反応のためには適当な酸化還元状態が保持されることが必要であることを示している。

本研究は以上のように、先きに本教室から報告されたラット肝ミトコンドリアでのグリシン代謝反応と全く同様の反応がバクテリア系でも起ることを証明したものであり、本反応の普遍性および生理的意義を解明するのに大きく貢献している。

よつて本論文は学位を授与するに値するものと認める。